

論文内容の要旨

論文提出者氏名 後藤 幸子

論文題目

BCL2 Inhibitor (ABT-737): A Restorer of Prednisolone Sensitivity in Early T-Cell Precursor-Acute Lymphoblastic Leukemia with High *MEF2C* Expression?

論文内容の要旨

T細胞性急性リンパ性白血病(T-ALL)は小児の急性リンパ性白血病の 10-15%を占め、比較的予後不良な一群であるが、近年の化学療法の強化によりその予後は改善し、現在では 80%近くの患者が治癒するようになった。しかし、約 20%の患者は現在も治癒が見込めず、このような患者の予後を改善するために、予後不良な T-ALL の薬剤耐性に寄与する生物学的特性を明らかにする必要がある。近年、T-ALL のなかで、予後不良な亜群として、early T-cell precursor ALL(ETP-ALL)が報告された。ETP-ALL は、T 細胞系と骨髄球系への分化能をもつが B 細胞系への分化能がない early T-cell precursors(ETPs)から発生すると考えられ、ETPs に酷似した遺伝子発現プロファイルを示す。細胞表面マーカー解析で、(1)CD1a と CD8 の発現がなく、(2)CD5 の発現は 75%未満、(3)CD13、CD33、CD34 や CD117 などの骨髄球系抗原が発現している、という 3 条件を満たすことで定義され、従来の化学療法では十分に治療効果がえられない。我々は小児の ETP-ALL における治療標的を明らかにするため、リンパ球系および骨髄球系細胞の分化にかかわる転写因子の遺伝子発現パターンの検討を行った。

まず、診断時の骨髄または末梢血が保存されていた 21 人(ETP-ALL : n=9、typical T-ALL : n=12)の患者検体を用いて、リアルタイム PCR 法で、転写因子(骨髄球への分化に関与する *C/EBPα*、*ID2*、T-ALL の白血病化に関与する *NOTCH1*、*LYL1*、*IL7R*、*LMO2*、骨髄球とリンパ球の分化に関わる *MEF2C*、*PU.1*、*FLT3*)の発現レベルを検討した。その結果、*MEF2C* と *FLT3* が ETP-ALL において typical T-ALL に比べて有意に高発現であった(*MEF2C* : P=0.039、*FLT3* : P=0.014)。*PU.1*、*C/EBPα*、*ID2*、*NOTCH1*、*LYL1*、*IL7R*、*LMO2* については、ETP-ALL と typical T-ALL で有意差はなかった。

次に*MEF2C*の発現が高いことがETP-ALLにおけるPSL抵抗性と関連があるかの検証を行うため、2 つのヒトT-ALL細胞株 (LOUCY:*MEF2C*が発現している、Jurkat : *MEF2C*は発現していない)のPSL感受性を比較した。PSLのIC50(μM)はLOUCYで188±18.3、Jurkatで612±42.0であり、いずれの細胞株もPSLに耐性であり、*MEF2C*の高発現のみがPSL耐性の機序ではないと考えられた。

MEF2CはBCL2の抗アポトーシス効果を増強する事が知られている。そこで、*MEF2C*の発現が高い細胞株でBCL2阻害剤(ABT-737)の投与によりBCL2の機能を阻害するとPSL感受性が改善するか検証した。ABT-737単剤のIC50を検討したところ、LOUCYはJurkatに比して高感受性であった(LOUCY vs Jurkat IC50: 32.9±10.0nM vs 955±9.3nM)。次に、PSLとABT-737の併用効果を確認したところ、LOUCYのPSLのIC50は有意に低下したが、JurkatではPSLのIC50の低下はみられなかった。Annexin V/PI解析でLOUCYのPSL (25μM)とABT-737(10nM)の単剤もしくは併用でのアポトーシスの程度を検証したところ、PSLとABT-737の併用でAnnexinV陽性細胞が増加した。以上の結果から、ABT-737を併用することによりLOUCYのPSL感受性が改善することが明らかとなった。

さらにIL3依存性マウスBリンパ球細胞株であるBaF3にレトロウィルスベクターを用いてMEF2Cを導入し、*MEF2C*が安定して発現しているBaF3細胞株(BaF3-MEF2C)を樹立し、PSL、ABT-737の感受性を検討した。BaF3-MEF2CはPSL感受性が低いが、BaF3-mockと比較して有意差はなかった。PSL (50μM)とABT-737(200nM、400nM)の併用でBaF3-mockに比較してBaF3-MEF2Cの細胞増殖は抑制され、PSLのIC50が有意に低下した。

BaF3のデータに基づいて、4人のT-ALLの患者(2人はETP-ALL、2人はtypical T-ALL)の白血病細胞に対するPSLとABT-737の単剤および両薬剤の併用効果を検証した。まず、typical T-ALLの患者の白血病細胞は*MEF2C*の発現が低く、ETP-ALLの患者の白血病細胞は*MEF2C*の発現が高いことを確認した。typical T-ALLの白血病細胞では、PSL(200μM)の使用で生細胞が50%以上減少したが、ETP-ALLでは50%未満であり、実際の臨床データと合致した。ETP-ALL患者の白血病細胞では、ABT-737(10nM)単剤では50%以上の生細胞の減少は認めなかった。しかし、一人のETP-ALLの患者の白血病細胞でPSL(200μM)とABT-737(10nM)の併用により50%以上の生細胞の減少を認め、PSL感受性の回復が確認

された。

ETP-ALLでは*MEF2C*のみならず、*FLT3*の発現も増加しているため、*MEF2C*の発現が高いT-ALL細胞で、FLT3阻害剤(PKC-412)とABT-737を併用することでPSLに対する感受性がより高くなるか検証した。定量PCR解析で、Jurkatに比べてLOUCYで*FLT3*の発現が高いことを確認した。PKC-412単剤の検討では、*FLT3*の発現レベルが高いLOUCYの方が*FLT3*の発現レベル低いJurkatに比べてPKC-412への感受性が高かった(LOUCY vs Jurkat, PKC412 IC50: 667nM vs 1807nM)。次に、LOUCYでPSLとPKC-412を併用する事でPSL感受性が改善するか検討したところ、PKC-412はPSLに対して拮抗的であった。最後にLOUCYでPKC-412をABT-737に併用することによりPSLの感受性が改善するか検証したが、PKC-412をABT-737に併用してもPSLのIC50の有意な低下は見られなかった。

我々は、*MEF2C*と*FLT3*ともにtypical T-ALLに比べてETP-ALLで高発現であることを見出した。このことは、ETPsに*MEF2C*や*FLT3*が異常に発現することで、分化停止が起こり、ETP-ALLが発生することを示唆すると考えられた。ABT-737は*MEF2C*を遺伝子導入したBaF3細胞と*MEF2C*の発現が高い白血病細胞株のPSL感受性を改善した。さらに、ETP-ALL患者の白血病細胞においても、PSLにABT-737を併用することでPSL単剤に比べて、生細胞が減ることが明らかとなった。以上の結果から、BCL2阻害剤がETP-ALL細胞のPSL感受性を改善しうることを明らかとなった。